三株烟草天蛾新细胞系的生长特性及重组蛋白表达

姜　磊[1]，李国勋[1,*]，李长友[1]，Robert R. GRANADOS[2]，Gary W. BLISSARD[2]
(1. 青岛农业大学中美无脊椎动物细胞工程中心，山东青岛 266109；
2. Boyce Thompson Institute for Plant Research (BTI) at Cornell University, Ithaca, NY 14853, U. S. A)

摘要：从尚未涉及的昆虫种类中建立新的细胞系能为基础研究和生物技术应用提供重要资源。本实验通过细胞培养技术，建立了 3 株来源于鳞翅目昆虫烟草天蛾 *Manduca sexta* 卵组织的新细胞系，分别命名为 QB-Ms1-8，QB-Ms2-2 和 QB-Ms2-7。这 3 株细胞已经培养在 TNM-FH 培养基中，28℃条件下传代培养了约 50 代，大部分细胞呈梭形，细胞群体倍增时间分别为 51，31 和 49 h。虽然这 3 株细胞系对苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus，AcMNPV)不够敏感，侵染后 96 h 感染率在 33% ~40% 之间，但是 QB-Ms2-2 细胞与 BTI-Tn5B1-4 细胞比较，分泌型碱性磷酸酶(SEAP)活性表达更高。本研究从建立的 3 株烟草天蛾新细胞系中筛选出 SEAP 高表达的细胞系 QB-Ms2-2，为进一步细胞克隆和筛选提供了新资源。
关键词：烟草天蛾；新细胞系；重组蛋白；生长曲线；苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒
中图分类号：Q962　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)11-1227-06

Growth characteristics and expression of recombinant proteins in three new cell lines from *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)

JIANG Lei[1], LI Guo-Xun[1,*], LI Chang-You[1], Robert R. GRANADOS[2], Gary W. BLISSARD[2] (1. A Center for Advanced Invertebrate Cell Engineering Qingdao Agricultural University-BTI at Cornell University, Qingdao 266109, China; 2. Boyce Thompson Institute for Plant Research (BTI) at Cornell University, Ithaca, NY 14853, U. S. A)

Abstract: The development of new cell lines from unusual and non-pest species may provide important source for basic research and biotechnology application. In this study, three new insect cell lines designated as QB-Ms1-8, QB-Ms2-2, and QB-Ms2-7, respectively, were established from eggs of *Manduca sexta*. These cells were subcultured approximately 50 passages in TNM-FH medium at 28℃. The majority of cells of the lines generally are spindle-shaped. The population doubling time of QB-Ms1-8, QB-Ms2-2 and QB-Ms2-7 cells was 51, 31 and 49 h, respectively. Although these lines were insusceptible to *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) with the infection rate of 33% - 40% at 96 h post infection, QB-Ms2-2 cell line showed higher level of secreted SEAP production in comparison with BTI-Tn5B1-4 cell line. In this study, a SEAP high expression type cell line, QB-M2-2 was isolated from the three new cell lines established from *M. sexta*, which may provide a source for searching novel clones with higher production of recombinant proteins.
Key words: *Manduca sexta*; insect cell line; recombinant protein; growth curve; *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)

随着生命科学的迅猛发展，在生物工程技术领域中，细胞工程已愈来愈受到重视。自从 Grace (1962)成功建立第一个传代昆虫细胞系以来，昆虫细胞培养技术得到了迅速的发展，到 2001 年，已经建立起了来自 100 多种昆虫的 500 多株细胞系(Lynn, 2001)。迄今为止，研究最多并被大量使用的昆虫细胞系主要是来源于草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的 Sf-21 或其克隆株 Sf-9，以及来源于粉

基金项目：国家重点基础研究发展规划("973"计划)项目(2009CB118902)；国家自然科学基金项目(30771451)
作者简介：姜磊，男，1984 年生，山东淄博人，硕士研究生，专业为昆虫病理学与害虫生物防治，E-mail: jianglei_sd@hotmail.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gxli@qau.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-03-19；接受日期 Accepted: 2010-09-12

纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的 BTI-Tn5B1-4（High Five）（Vaughn *et al*.，1977；Granados *et al*.，1994）。

昆虫细胞系已被越来越广泛地应用于各个研究领域。在生物杀虫剂研究方面，通过昆虫细胞的大规模、低成本培养技术可实现昆虫病原病毒、微孢子虫等生物杀虫剂的工业化生产（Granados *et al*.，2007）；在基础生物学研究方面，利用昆虫细胞系可开展昆虫生理学、生物化学、遗传学和病理学等的研究；在基础医学研究方面，可利用昆虫细胞系来研究以昆虫作为媒介的引起人类疾病的病毒、原生动物等在昆虫细胞中的发育和侵染；在医药方面，由于昆虫细胞系-杆状病毒表达载体体系（baculovirus expression vector system，BEVS）表达量高、安全、容量大、有真核细胞后修饰能力等的优点受到了特别关注，被广泛地应用于生产各种疫苗和药物等（van Oers，2006）。由此可见昆虫细胞培养技术具有广阔的市场前景，被广泛应用于农业、生物学和医学等领域。

昆虫是世界上最大的生物种群，但是从目前只在 100 多种昆虫建立了 500 多株细胞系的现况来看，这一研究领域还有广阔的发展空间。传统的昆虫细胞培养技术是作为研究昆虫生理学、病理学和病原微生物等的途径，因此大量的昆虫细胞系来源于鳞翅目和双翅目的农业和卫生害虫（Granados *et al*.，2007）；而随着昆虫细胞在重组蛋白表达方面的能力被人们发掘，建立和筛选有效支持病毒增殖和外源基因高水平表达的细胞系成为这一技术领域研究亟待解决的问题。

第一作者所在实验室建立了多株烟草天蛾 *Manduca sexta* 细胞系，本实验主要研究了 3 株烟草天蛾细胞系（QB-Ms2-2，QB-Ms2-7 和 QB-Ms1-8）的生物学特性以及用这些细胞表达几种重组蛋白的水平。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞系：供试细胞来源于烟草天蛾胚胎组织的细胞系，由青岛农业大学中美无脊椎动物细胞工程中心建立，并传代培养 50 代以上。BTI-Tn5B1-4 和 Sf-9 细胞来自合作单位美国康奈尔大学 BTI 研究所。

1.1.2　病毒：苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus，AcMNPV）AcMNPV-1A 株，毒力滴度为 1.9×10^9 $TCID_{50}$/mL；含 β-半乳糖苷酶基（β-gal）的重组病毒 AcMNPV-β-gal，毒力滴度为 5.0×10^7 pfu/mL；含分泌型碱性磷酸酶（secreted alkaline phosphatase，SEAP）的重组病毒 AcMNPV-SEAP，毒力滴度为 1.35×10^8 pfu/mL。以上病毒均来自美国康奈尔大学 BTI 研究所，病毒滴度按照 Wood（1977）的方法用 Sf-9 细胞进行空斑测定。

1.1.3　培养基：TNM-FH 昆虫细胞培养基由 Grace 培养基（Gibco 公司）改进，并辅以 10% 胎牛血清（MDgenics 公司）。

1.1.4　试剂：基因组 DNA 纯化试剂盒（Toyobo 公司），Taq 聚合酶（Ferments 公司），随机扩增引物 OPU-05 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.5　设备：IX71 荧光倒置相差显微镜（Olympus，日本），蛋白分析仪（Dynex，美国），GE-750 细胞破碎仪（Scienceware，美国）。

1.2　方法

1.2.1　细胞原代培养：按照 Meng 等（2008）的方法，取实验室饲养的烟草天蛾种群的新鲜卵，分别用 10% 次氯酸钠和 75% 酒精表面消毒 5 min，再用 TNM-FH（Gibco，USA）培养基洗两次后，卵被转移到一个细胞滤网器（BD Falcon，USA），并将滤网器放入有 10 mL 培养基的平皿中，将细胞充分磨碎后，将卵组织滤液稀释成不同浓度，分装于 25 cm^2 的培养瓶（Corning，New York，USA）中，置 28℃ 培养。每 2 周更换一半新鲜培养基。3 个月后，当形成的细胞铺满瓶底后，进行第一次传代。待细胞生长稳定后，每周传代一次。

1.2.2　基因组 DNA 的 RAPD-PCR 分析：使用 Toyobo 公司的基因组 DNA 纯化试剂盒，分别提取烟草天蛾卵粒的基因组 DNA 和烟草天蛾细胞的基因组 DNA。使用随机扩增引物进行 RAPD-PCR 分析，参照 Meng 等（2008）的方法，鉴定细胞系与原始昆虫组织的同源性。

1.2.3　细胞形态观察：采用 TNM-FH 培养基，按照 1∶4 的比例将细胞每隔 6～7 d 传代一次，28℃ 培养，在倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.2.4　细胞生长曲线的测定：按照 Granados 等（1994）的方法测定细胞生长曲线将对数生长期的细胞按 2.0×10^5 cells/mL 的浓度加到 25 cm^2 的细胞培养瓶中，每瓶 5 mL，28℃ 下培养，每 24 h 计数。计数时取一瓶细胞中生长均匀的 5 个点计数，

并按照下面公式计算出细胞浓度。

$$细胞浓度 = \frac{5个点的平均细胞数 \times 4.17 \times 10^4}{5\ mL}$$

根据计算结果，以时间为横坐标，细胞生长密度为纵坐标，绘出细胞生长曲线，按照 Hayflick (1973) 的方法计算细胞群体倍增时间(T)，公式如下。

$T = 1/K$

$\log N = \log N_0 + Kt\log 2$

其中，T = 细胞在对数生长期平均生长 1 倍所需要的时间；K = 系数；t = 从接种到测定细胞数的时间；N_0 = 接种时的细胞数；N = 时刻 t 所测定的细胞数；log2 = 0.301。

1.2.5　病毒侵染及病毒产量测定：取对数生长期细胞，按 1.0×10^5 细胞/孔的量接入 24 孔细胞培养板，28℃培养过夜；细胞贴壁后弃掉培养基，每孔加入 0.5 mL MOI = 10 的 AcMNPV-1A 病毒悬液，在摇床上吸附侵染 1 h 后弃掉病毒悬液，补充 1 mL 新鲜的 TNM-FH 培养基，28℃侵染 96 h，然后将 24 孔板中的细胞悬浮，取 0.4 mL 用血球计数板计数感染细胞占全部细胞的百分比，0.5 mL 用超声波破碎，释放出多角体后，用血球计数板计数病毒多角体产量。病毒产量按照 Wang 等(1992)的方法进行计算。

$$OBs/cell = \frac{OBs/mL}{全部细胞数量/mL \times 细胞感染率}$$

1.2.6　β-半乳糖苷酶(β-gal)和分泌型碱性磷酸酶(SEAP)的表达：取对数生长期细胞，按 1.0×10^5 细胞/孔的量接入 24 孔细胞培养板中，28℃培养，细胞贴壁后吸去培养基，加入感染复数 MOI = 10 的重组病毒 AcMNPV-SEAP 和 AcMNPV-β-gal 进行细胞侵染，侵染方法同上。侵染后分别于 2，4，6，8 d和 3，5，7，9 d 取样，并暂时保存于 4℃待测。按 Davis 等(1992)和 Zheng 等(2005)的方法，测定重组蛋白 β-半乳糖苷酶(β-gal)和分泌型碱性磷酸酶(SEAP)的活性。

β-半乳糖苷酶活性：

$$IU/mL = \frac{OD \times 1.5}{0.0045 \times 2 \times 0.002}$$

分泌型碱性磷酸酶活性：

$$IU/mL = \frac{\Delta OD/min \times 0.222}{0.56 \times 18.2 \times 0.002}$$

1.3　数据统计与分析

本研究所得数据使用 EXCEL 进行多重方差分析，计算出标准差。

2　结果与分析

2.1　细胞株基因组 DNA 的 RAPD-PCR 分析

为了确认该细胞是来自烟草天蛾的遗传同源性，我们选择特异性引物 OPU-05 进行 RAPD-PCR 分析，以 BTI-Tn5B1-4 和 Sf-9 细胞作为对照。结果见图 1。

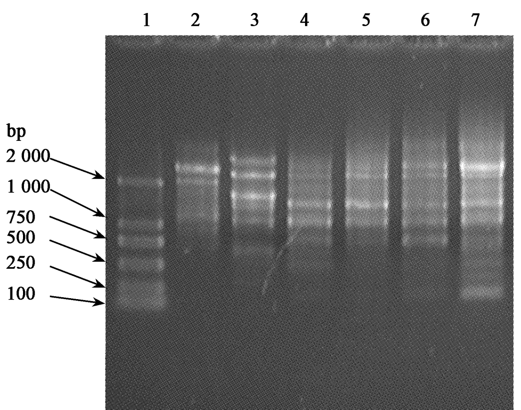


图 1　烟草天蛾不同细胞系基因组 DNA 的 RAPD-PCR 鉴定图谱

Fig. 1　Random amplified polymorphic DNA (RAPD) profile of different cell lines of *Manduca sexta*

1：DNA 分子量标准 (DL2000 DNA molecular weight marker)；2：BTI-Tn5B1-4 细胞(BTI-Tn5B1-4 cell)；3：Sf-9 细胞(Sf-9 cell)；4：卵(Egg)；5：细胞系 QB-Ms1-8 (Cell line QB-Ms1-8)；6：细胞系 QB-Ms2-2 (Cell line QB-Ms2-2)；7：细胞系 QB-Ms2-7 (Cell line QB-Ms2-7).

结果表明，在使用特异性引物 OPU-05 时，烟草天蛾卵、各株烟草天蛾细胞系的 DNA 扩增谱带相同，而 Sf-9 细胞的 DNA 扩增谱带略有不同，烟草天蛾卵和各株烟草天蛾细胞系的 DNA 扩增谱代均与 BTI-Tn5B1-4 细胞的明显不同。以上结果表明烟草天蛾各株细胞与原始来源组织(烟草天蛾卵)具有相同的遗传背景。

2.2　烟草天蛾细胞形态

在倒置相差显微镜下观察烟草天蛾细胞系的各株细胞。其中纺锤形细胞占的比例较大(80% 以上)；球形细胞占的比例较小。细胞形态见图 2。

2.3　烟草天蛾细胞生长曲线

细胞按 2.0×10^5 cells/mL 的浓度接种到 25 cm^2 的细胞培养瓶中，每 24 h 测定一次烟草天蛾细胞的生长密度，并以细胞密度为纵轴，生长时间为横轴，绘制出生长曲线。

如图 3 中所示，烟草天蛾细胞生长较为缓慢，生长最快为 QB-Ms2-2 细胞，群体倍增时间为 31 h；最慢为 QB-Ms1-8 细胞，群体倍增时间为 51 h；QB-

Ms2-7 细胞群体倍增时间为 49 h；细胞生长浓度最高可达到 1×10^6 cells/mL。细胞生长 168 h 后由于培养基营养成分的消耗和代谢产物的增加，导致细胞生长速率减慢，细胞数量开始下降。

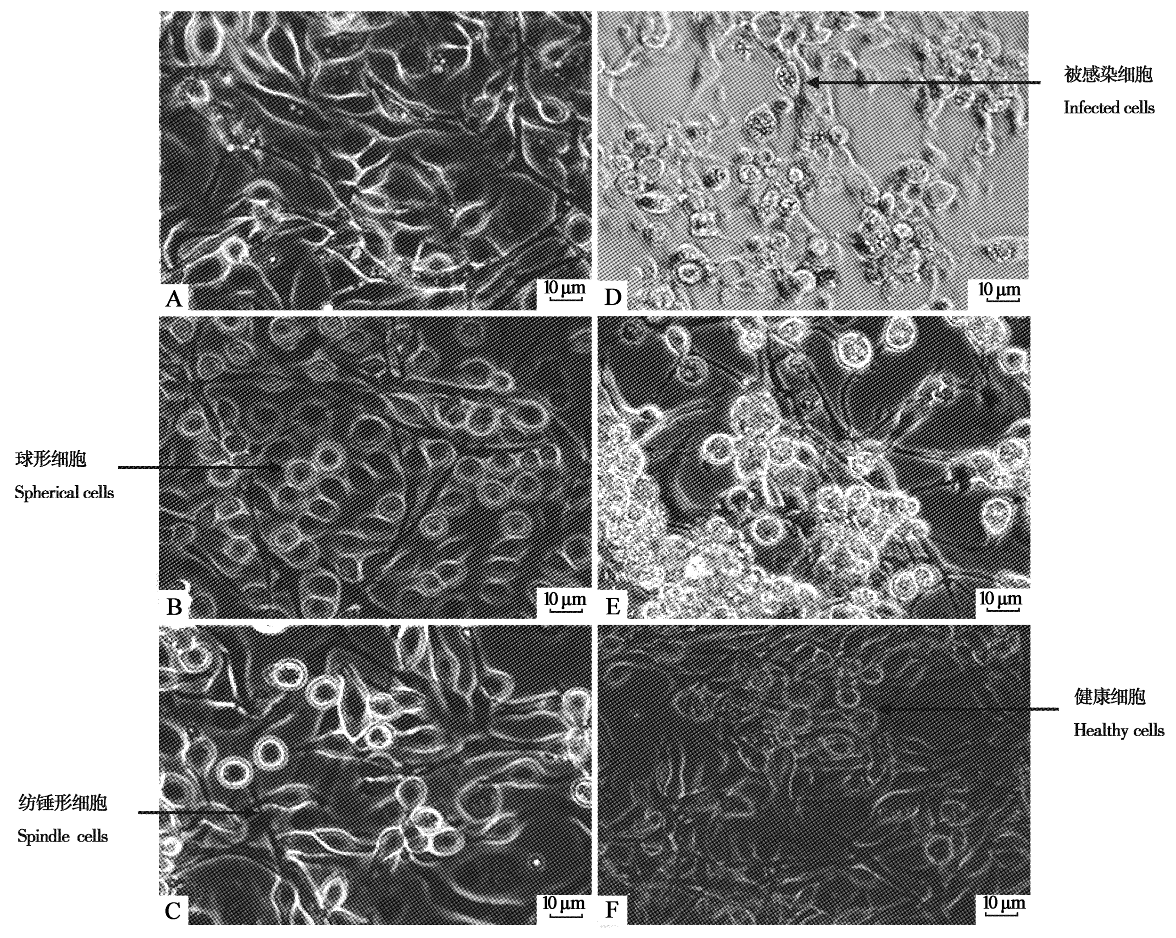


图 2 烟草天蛾细胞系形态(A, B, C)及病毒感染(D, E, F)

Fig. 2 Morphology (A, B, C) and AcMNPV infection (D, E, F) of *Manduca sexta* cell lines

A, D：细胞系 QB-Ms2-2 (QB-Ms2-2 cells)；B, E：细胞系 QB-Ms2-7 (QB-Ms2-7 cells)；C, F：细胞系 QB-Ms1-8 (QB-Ms1-8 cells).

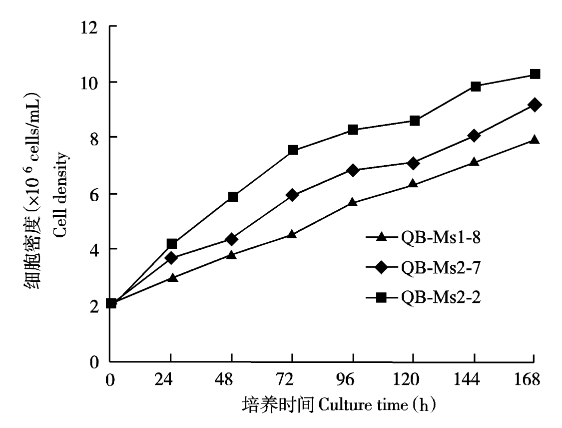


图 3 烟草天蛾细胞 QB-Ms1-8, QB-Ms2-2 和 QB-Ms2-7 的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *Manduca sexta* cell lines QB-Ms1-8, QB-Ms2-2 and QB-Ms2-7

2.4 AcMNPV 对烟草天蛾细胞系的侵染及病毒产量测定

烟草天蛾细胞接种 AcMNPV-1A 96 h 后有较为明显的细胞病理变化见图 2(D, E, F)，细胞核膨大，细胞内出现少量折光性强的多角体。但是感染率比实验室常用的细胞系 BTI-Tn5B1-4 和 Sf-21 及其克隆株 Sf-9 要低很多，最高仅为 40%，感染率和多角体产量见表 1。

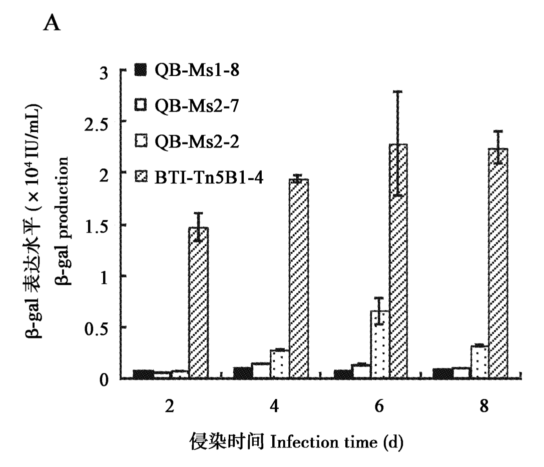
表 1 侵染后 96 h 烟草天蛾细胞病毒感染率和病毒产量

Table 1 The infection rate and production of AcMNPV in *Manduca sexta* cell lines at 96 h post infection

细胞系 Cell line	感染率(%) Infection rate	多角体产量(OBs/cell) OB production
QB-Ms2-7	36	21.29 ± 4.67
QB-Ms2-2	40	48.42 ± 1.65
QB-Ms1-8	33	7.14 ± 1.43

2.5　AcMNPV-β-gal 和 AcMNPV-SEAP 表达水平分析

重组病毒侵染烟草天蛾细胞，β-gal 活性在细胞培养过程中的变化趋势见图 4(A)，QB-Ms2-2 细胞的 β-gal 活性最高，在第 6 天达到最大值 0.65×10^4 IU/mL，但远远小于同期 H5 细胞 1.54×10^4 IU/mL 的 β-gal 活性。SEAP 活性随细胞培养时间的变化较平缓(图 4：B)，QB-Ms2-2 表达 SEAP 活性在第 5 天达到最大值，达到 2.33 IU/mL。相比 H5 在第 7 天达到最高，烟草天蛾 SEAP 表达量的峰值较早出现，表达量比 H5 细胞(2.28 IU/mL)稍高。



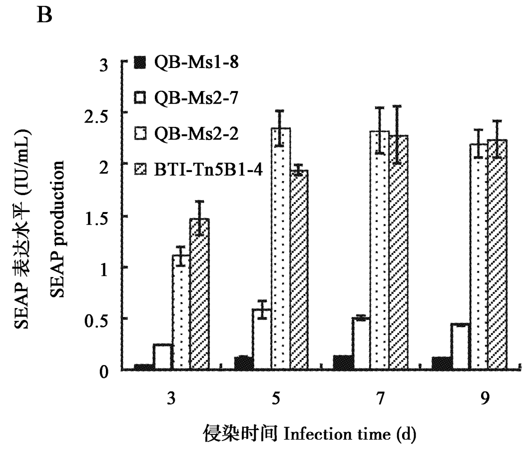


图 4　QB-Ms1-8，QB-Ms2-2，QB-Ms2-7 和 BTI-Tn5B1-4 细胞的重组蛋白 AcMNPV-β-gal(A)和 AcMNPV SEAP(B)表达水平

Fig. 4　Expression level of the recombined proteins AcMNPV-β-gal (A) and AcMNPV-SEAP (B) in QB-Ms1-8，QB-Ms2-2，QB-Ms2-7 and BTI-Tn5B1-4 cells

3　讨　　论

本研究建立了 3 株烟草天蛾新细胞系 QB-Ms1-8，QB-Ms2-2 和 QB-Ms2-7。从原代培养到第一次传代，大约为 3 个月，再经过 50 余次传代后，完成了细胞系的形态观察、生长特性、病毒侵染及重组蛋白表达等测定。生长在 TNM-FH 培养基中的 3 株细胞系贴壁性与广泛应用的 Sf-9 细胞相似，与 BTI-Tn5B1-4 细胞形态相似但个体稍小。生长特性测定可以看出，该细胞在低密度下生长缓慢，最高生长密度比 Sf-9 和 BTI-Tn5B1-4 细胞都小。该 3 株细胞对 AcMNPV 的敏感性不高，无论病毒感染率还是病毒(OB)产量，都远不如 Sf-9 和 BTI-Tn5B1-4 细胞。但该研究测定 Ms2-2 细胞重组蛋白 SEAP 表达水平比 BTI-Tn5B1-4 细胞略高(BTI-Tn5B1-4 的 SEAP 表达比 Sf-9 高 5 倍以上)，而且 SEAP 产量在侵染后第 5 天就达到最大值，而 BTI-Tn5B1-4 细胞在第 7 天时才达到最大值。值得注意的是，Ms2-2 细胞系在 3 株细胞系中感染率和病毒产量(OB)为最高，分别为 40% 和 48 OBs/cell，但与 BTI-Tn5B1-4 细胞相比，其感染率和病毒产量也只有 BTI-Tn5B1-4 细胞的一半。可是 Ms2-2 细胞系却在 SEAP 产量上与 BTI-Tn5B1-4 细胞相当。可见，在 Ms2-2 细胞这个未经纯化的混合细胞群体中，存在 SEAP 表达极高的细胞。因此，该细胞系的建立为进一步细胞克隆及筛选高产的新细胞系提供了良好的资源。

20 世纪 80 年代初期至今，人们对杆状病毒-昆虫细胞表达载体系统的深入研究及其取得的巨大成就使得昆虫细胞备受青睐(Harris *et al*.，1999；Platteborze and Broomfield，2000；Wang *et al*.，2000)。由于多角体启动子控制下插入的外源基因能够超高表达，所以该病毒是目前应用最广泛的真核蛋白表达载体。但获得异源蛋白超高表达的能力也受昆虫细胞种类而制约。因此开发新的昆虫细胞系，建立和筛选有效支持病毒增殖和外源基因高水平表达的细胞系将成为这一技术领域研究的重要环节。

参 考 文 献 (References)

Davis TR，Trotter KM，Granados RR，Wood HA，1992. Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production，glycosylation and secretion. *Biotechnology*，10：1148－1150.

Grace TDC, 1962, Establishment of four strains of cells from insect tissue grown *in vitro*. *Nature*, 195: 788 – 789.

Granados RR, LI GX, Blissard GW, 2007. Insect cell culture and biotechnology. *Virologica Sinica*, 22(2): 83 – 93.

Granados RR, LI GX, Derksen ACG, McKenna KA, 1994. A new insect line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 64: 260 – 266.

Harris JD, Seid CA, Fontenot GK, Liu HF, 1999. Expression and purification of recombinant human *Zona pellucida* proteins. *Protein Expression and Purification*, 16(2): 298 – 307.

Hayflick L, 1973. Theory of population increase by subcultivation. In: Kruse PF, Patterson MK eds. Tissue Culture Methods and Application. Academic Press, New York. 222 – 223.

Lynn DE, 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 37: 319 – 321.

Meng MJ, Li TL, Li CY, Li GX, 2008. A suspended cell line from *Trichoplusia ni* (Lepidoptera): characterization and expression of recombinant proteins. *Insect Science*, 15: 423 – 428.

Platteborze PL, Broomfield CA, 2000. Expression of biologically active human butyrycholinesterase in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*). *Biotechnol. Appl. Biochem*, 31(3): 225 – 229.

van Oers MM, 2006. Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv. Virus Res.*, 68: 193 – 253.

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P, 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro*, 13: 213 – 217.

Wang MY, Yang YH, Lee HS, Lai SY, 2000. Production of functional hepatocyte growth factor (HGF) in insect cells infected with an HGF-recombinant baculovirus in a serum-free medium. *Biotechnol. Prog.*, 16(2): 146 – 151.

Wang P, Granados RR, Shuler ML, 1992. Studies on serum-free culture of insect cells for virus propagation and recombinant protein production. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 46 – 53.

Wood HA, 1977. An agar overlay plaque assay method for *Autographa californica* nuclear-polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 29(3): 304 – 307.

Zheng GL, Li CY, Li GX, Wang P, Granados RR, 2005. Construction and characteristics of a transformed lepidopteran cell clone expressing baculovirus p35. *Chinese Science Bulletin*, 50 (23): 2728 – 2732.

（责任编辑：赵利辉）